

Synthetic biology와 인공균주

김선창, 유병조/한국과학기술원

서론

지금까지 수많은 미생물들의 유전체 염기서열이 밝혀지고 이를 이용한 functional genomics와 comparative genomics가 진행되면서 많은 수의 유전자 기능이 밝혀지고 있다. 하지만 생명체와 같은 복잡계를 이해하기 위해서는 이를 이루는 유전자뿐만 아니라 그들 상호간의 작용 (genetic network)을 이해하여야 한다. 따라서, systems biology 와 진보된 genomic techniques으로 미생물내의 밝혀지지 않았던 유전자의 기능과 그들 간의 동적인 네트워크 (dynamic network)가 규명되어지고 있다. 이렇게 생명체 내에서 유전자의 기능과 그들의 상호관계를 이해하고 규명함으로써 얻어진 유전체 정보를 바탕으로 우리가 새롭게 개척하고 도전해 볼 수 있는 중요한 분야 중 하나는 우리가 원하는 기능을 가진 새로운 생명체를 인공적으로 만드는 것이다. 최근 이러한 시도가 여러 그룹에서 본격적으로 진행되어지고 있는데, 이러한 생명연구의 한 응용분야가 Synthetic biology와 인공균주 개발이다.

1. Synthetic biology

Synthetic biology는 지금까지 축적된 생명정보와 현존하는 biological components나 biological system을 이용하여 지금까지 자연계에 존재하지 않으면서 우리가 원하는 새로운 기능의 biological components나 biological system을 제작하는 연구분야이다 (1).

즉, Synthetic biology는 여러 가지 유전체 기술들과 지금까지 축적된 생명정보를 이용하여 새로운 artificial biological systems을 구축하는 방법들을 연구하는 분야이다. 따라서 어떤 원인과 현상을 규명하고 밝혀내는 기존의 연구들과는 달리 지금까지 밝혀진 사실에 바탕을 두고 우리가 원하는 기능을 수행할 수 있는 새로운 artificial biological systems을 만들어 내기 위해 자연계에 존재하는 다양한 조절작용 기작 (regulatory system)과 이를 구성하는 biological component들을 새로운 방식으로 조합하거나, 그것들을 보다 간단한 system으로 변형시켜 우리가 원하는 기능을 작동시키는 것이다. 따라서 synthetic biology는 생물학에 있어서 가장 최첨단의 응용분야라고 할 수 있다.

이러한 synthetic biology가 실현할 수 있는 예로서는 다음과 같은 것이 있을 수 있다. 갈수록 심각해 지는 에너지 고갈로 차세대 에너지원으로 부각되고 있는 수소를 효율적으로 대량생산 할 수 있는 특정 미생물을 설계하여 대량의 수소연료를 생산 에너지 문제를 해결할 수도 있다. 또한 우라늄과 같은 방사성 물질이나 TNT같은 위험 물질들을 검출하고 분해할 수 있는 biological system을 구축한다면 환경오염 문제를 해결할 수

도 있을 것이다. 그리고 특정 악성 virus나 암세포만을 공격하는 biological weapon을 개발하여 질병을 퇴치 시킬 수도 있을 것이다. 이런 일련의 일들을 현실화 시키기 위해서 Synthetic biology는 우선적으로 간단한 미생물들의 biological component들이나 그들이 가지고 있는 유전체를 재설계 (Redesign) 하는 방법을 선택하였다. 미생물은 간단한 영양소들을 제공 받을 때 그 생명현상을 유지할 수 있는 자연계에 존재하는 가장 단순한 생명체이기 때문에 다른 생명체에 비해 Synthetic biology system을 구축할 수 있고 실현할 수 있는 가장 기본적인 생물환경을 제공해 준다. 즉, 비유하자면 Synthetic biology는 미생물을 우리가 원하는 아주 작게 프로그램된 컴퓨터로 만드는 것이라 할 수 있다.

1) 프로그램된 세포 (programmable cells)

미생물을 프로그램된 컴퓨터로 만드는 가장 기본적인 작업은 미생물들이 주위의 신호에 정확하게 반응하게 만드는 일이라 할 수 있다. 이러한 일의 대표적인 경우가 Boston University의 Collins박사의 programmable cell이다 (2). Collins 박사는 Synthetic biology에 있어서 가장 중요한 것은 유전자 조절계 (Gene regulatory networks)를 얼마나 잘 이용하고 개발하는 것이라고 말하고 있다. 그래서 Collins 박사팀은 미생물 외부에서 오는 자극을 마치 컴퓨터의 정보 입력 (input)과 출력 (output)과 같은 형태로 반응하고 작용하는 조절회로 (regulatory circuitry)를 만들어 대장균에 적용함으로써 간단하게 프로그램된 세포를 구축하였다. 이러한 프로그램된 세포를 구축하기 위해서는 주위 자극에 반응하는 Biosensor module과 이것을 다른 신호로 전환할 수 있는 Engineered gene regulatory network, 그리고 그 신호를 생물적인 반응으로 표출 시키게 해주는 Output interface가 있어야 한다 (Fig. 1)

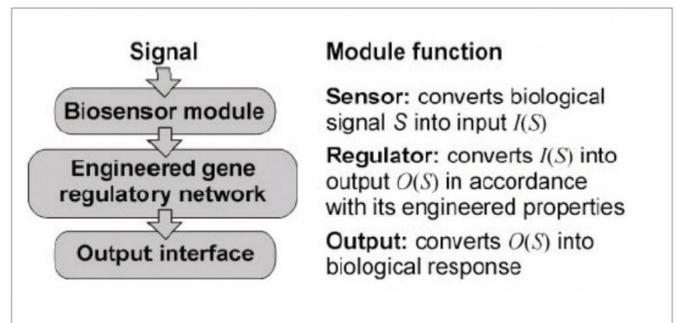


Fig. 1. 간단하게 프로그램된 세포의 modular 구조.

이러한 개념을 바탕으로 설계한 프로그램된 세포의 한 예가 자외선 (Uv) 과 mitomycin C (MMC)와 같은 DNA damage유발 물질에 즉각적으로 반응하고 반응결과로 GFP를 발현시켜 주위에서 DNA damage신호가 온다는 것을 알릴 수 있는 세포이다 (Fig. 2). 이와 더불어 GFP대신에 그 신호의 반응결과로써 biofilm을 생성시키는 *traA* 을 발현시키는 세포 또한 구축하였다.

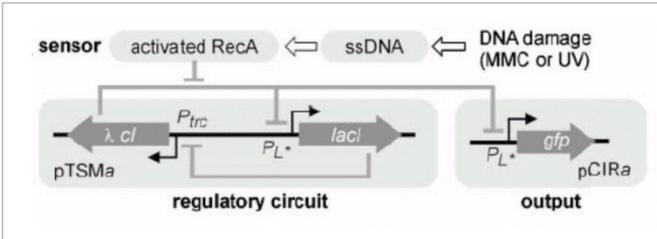


Fig. 2. 세포내 SOS 신호전달 경로를 위한 회로도. SOS 신호가 없을시에는 λcl 가 발현되어 P_{trc} 에 결합 *lacI*와 *gfp*의 발현을 저해한다. 그러나 DNA damage에의 경로로 λcl 를 효과적으로 분해할 수 있는 *recA*가 발현되면 *lacI*와 *gfp*의 발현으로 대장균이 푸른 빛을 내게 된다.

또 다른 예로, MIT의 Drew Endy박사는 이러한 regulatory circuitry들을 모두 합성하여 자유자재로 우리가 원하는 biological system을 구축할 수 있게 하는 BioBricks을 고안 설계하였다 (3). 이것은 생물학적 조절기작을 이루고 있는 구성요소들인 promoter, terminator, ribosome binding sites 과 reporter, tested genes등을 가지고 새로운 regulatory circuitry를 만들어 생명체내에서 우리가 원하는 대로 작동하도록 제작되어졌다. 이러한 것들을 응용한다면 TNT와 같은 위험물질을 검색하여 발광을 내도록 고안된 새로운 regulatory circuitry를 제작할 수 있으며, reporter gene으로 TNT를 분해할 수 있는 유전자를 도입한다면 TNT의 검출 및 분해까지 수행하는 미생물을 제조할 수 있을 것이다. 즉 BioBricks은 생명체 내에서 밝혀진 여러 가지 regulation system을 구성하는 하나하나를 각각의 BioBrick으로 제조하여 모아놓은 생명체의 공구세트라고 표현할 수 있다. 따라서 필요에 따라 조합하여 우리가 원하는 regulatory circuitry 만들어 내는 것이다.

2) 생명체의 합성

Synthetic biology에서 우리가 원하는 biological system의 제작 및 제조를 하나의 기능을 수행하는 작은 유전자군에서 더욱더 확장시켜 나간다면 결국 우리가 원하는 새로운 생명체를 직접 창조하는 작업을 하게 될 것이다. 이러한 일은 인간을 창조주의 위치에 올려놓게 되는 획기적인 일인 동시에 많은 종교적 도덕적 비판과 토론이 선행되어 질 것이다. 이러한 시도는 아직까지는 뚜렷할 만한 성과를 내고 있지는 않지만 이러한 일들이 결코 먼 미래의 일만을 아니라는 것이 최근에 이루어지고 있는 연구들에 의해 입증되고 있다.

그 대표적인 예가 DNA sequence정보와 nucleotides의 화학적 합성기술 만을 가지고 활성을 갖는 virus를 합성하는 데 성공한 일이다. 그 첫번째 신호탄은 2002년 9월 미국주립대의 Wimmer 팀이 7.5 kb의 폴리오 바이러스를 합성해 내면서 시작되었다 (4). 그리고 바로 이어 미국 IBEA (Institute for Biological Energy Alternatives)의 Craig Venter팀은 5.4 kb 정도의 박테리오파지 ϕ X174를 이전보다 간단한 system으로 단 14일만

에 제조하는데 성공하였다 (5). 이러한 결과들은 우리가 원하는 기능의 유전자군을 단지 DNA sequence를 바탕으로 화학적으로 합성하여 그 기능을 발휘할 수 있게 할 수 있을 뿐만 아니라 더 나아가서는 우리가 원하는 인공 미생물들을 직접 합성하여 창조해 낼 수 있다는 가능성을 제시해주고 있다. 이를 위해서는 빠르고 값싼 DNA sequencing과 합성이 뒤따라주어야만 새로운 biological system을 빠르게 고안하고 제작하며 결과를 검토 할 수 있을 것이다. 또한 이러한 생물 system을 고안하고 시뮬레이션 할 수 있는 효과적인 software들도 빠르게 개발되어져야 한다.

이와 더불어 Synthetic biology를 보다 광범위하게 확장하면서 정확하게 응용해나가기 위해서는 유전자의 기능과 그들 간의 상호관계를 정확하게 파악할 수 있는 최소유전체 (minimal gene set)를 가지는 생명체를 제조하는 것이 무엇보다도 필요하다. 이는 앞서 소개된 한가지 주위신호에 대해 반응하는 일차원적인 것을 뛰어넘어 세포 자체가 복잡한 주위환경에서도 우리가 원하는 기능을 충분히 그리고 정확하게 수행하기 위해서 꼭 필요한 일이기 때문이다. 따라서 Synthetic biology는 간단하면서도 모든 생명현상이 보다 정확하게 규명되어진 새로운 인공균주를 기반으로 삼고 응용되어질 때 한 단계 높은 수준으로 발전할 수 있다. 이러한 점을 인식할 때, 본 연구진이 진행하고 있는 최소 유전체를 갖는 인공균주의 구축은 그 자체로 Synthetic biology 분야의 한 분야로 자리 매김 할 수 있을 뿐만 아니라 Synthetic biology에 꼭 필요한 연구가 될 수 있을 것이다.

2. 최소유전체를 갖는 인공균주 개발

최소유전체를 갖는 인공균주를 만들기 위해서 본 연구진은 미생물 중에서 가장 널리 사용되어지면서 그 생명정보가 가장 많이 밝혀져 있는 대장균을 선택하였다. 이러한 대장균을 가지고 우선, Ecocyc 및 Metacyc (6)와 대장균 database (7-9)들에 근거하여 성장에 불필요하거나 중요하지 않으면서 그 기능이 밝혀져 있지 않는 많은 유전자들을 선택하고 (Fig. 3) 이들을 단계적으로 제거함으로써 최소유전체만을 가지는 인공균주를 구축하고 있다.

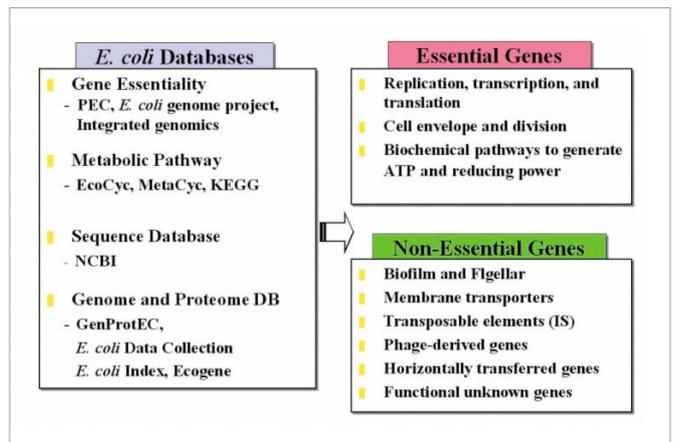


Fig. 3. 대장균의 성장에 불필요한 유전자 선택

1). 대장균 성장에 불필요한 유전자군의 선택

Fig. 3에서 보는 것과 같이 대장균 유전체내에는 성장에 불필요한 많은 유전자들이 존재한다. 현재와 같은 실험조건과 발효조건 하에서 대장균의

biofilm과 flagellar 합성은 불필요하며 많은 transport system도 필요치 않다. 또한 대장균 유전체의 불안정성을 야기하는 IS와 Phage유래 유전자 또한 불필요하며 진화하는 동안 외부에서 흘러 들어온 여러 다양한 유전자 또한 불필요하다고 볼 수 있다. 그리고 약 30%정도의 기능이 밝혀지지 않은 유전자들 중 대장균의 성장에 불필요한 유전자들을 제거함으로써 유전자의 기능과 그들의 상호관계를 보다 정확하게 규명할 수 있는 최소 유전체를 만들 수 있다.

2. 유전체 부분 제거기술 개발 (Tn5-mediated Cre/loxP excision system)

대장균 유전자 및 유전체 일부를 임의로 원하는 대로 제거시키기 위하여 transposon과 Cre/loxP 재조합 방법을 이용한 Tn5-mediated Cre/loxP excision system (10) 을 응용 사용한다. 이 방법에서는 하나의 loxP site와 서로 다른 선별마커(Km^rGFP, Cm^r)를 갖는 두 종류의 transposon이 대장균 유전체내 임의의 위치에 삽입되어져 그 위치가 확인되어진 두 종류의 transposon 삽입 libraries를 사용한다. 즉 제거하고자 하는 불필요한 유전체 부위의 앞뒤에 transposon이 삽입된 두 종류의 mutant들을 각각의 libraries로부터 선택하고, P1 transduction을 이용하여 하나의 유전체 내로 두 종류의 transposon을 옮겨놓게 된다. 그런 다음 Cre 재조합 효소를 발현시켜 target 부위를 제거 시킨다 (Fig. 4). 이러한 기술을 사용함으로써 대장균내 원하는 유전체 부분들을 동시에 효과적으로 제거할 수 있다.

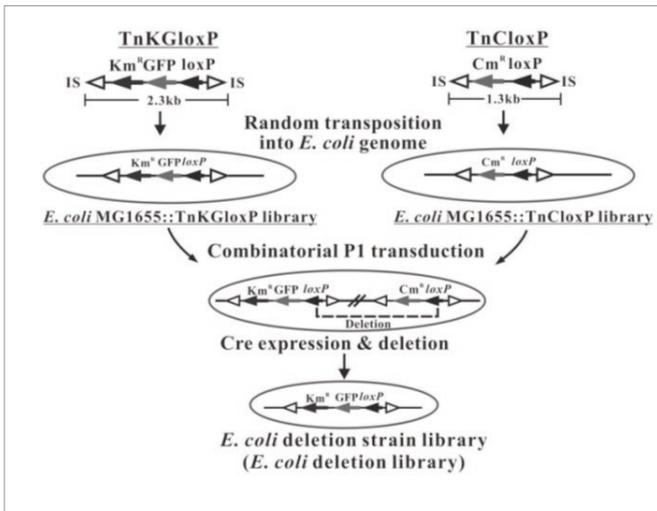


Fig. 4. Transposon을 매개로한 Cre/loxP 재조합 기법을 이용한 target 유전체 부분 제거법. 하나의 loxP site와 서로 다른 선별마커(Km^r-GFP, Cm^r)를 포함하는 두 종류의 transposon (TnKGloxP, TnCloxP)을 제작하여, 이들을 대장균의 유전체 내의 임의의 위치로 삽입시킨 두 종류의 Transposon 삽입 libraries(*E. coli* MG1655::TnKGloxP library, *E. coli* MG1655::TnCloxP library)를 제조한다. 이를 이용하여 제거하고자 하는 부분의 유전체 부분의 양끝단에 Transposon이 삽입된 mutant를 각각의 mutant libraries로부터 선택하고, P1 transduction을 이용하여 하나의 유전체내에 두개의 transposon을 옮겨놓게 된다. 그런 다음 Cre 재조합 효소를 발현시켜 target 부위를 제거 시킨다.

이와 같은 방법으로 제거되어진 대장균 유전체 부분들은 P1 transduction 및 genome swapping을 이용하여 하나의 유전체내로 옮겨질 수 있다 (Fig. 5). 이러한 과정을 반복 수행함으로써 불필요한 유전자군이 제거되

어진 다양한 대장균 인공균주를 구축할 수 있고 이들의 조합으로 모든 기능이 알려진 유전자만으로 유전체가 구성되어진 인공균주를 만들고 있을 것이다. 또한 이러한 인공균주 중에 최소의 유전자만으로 성장을 할 수 있는 최소 유전체 또한 제작되어질 수 있다.

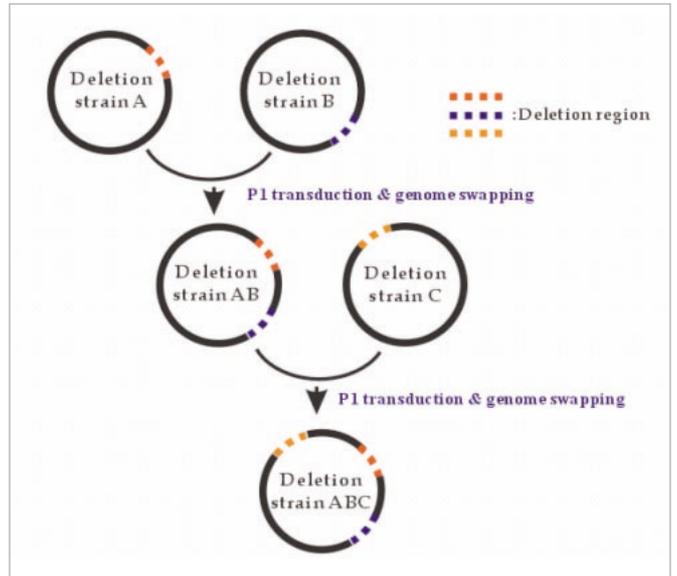


Fig. 5. P1 transduction 및 genome swapping을 이용한 유전체 축소 균주 구축. 각각의 유전체 제거구간들은 P1 transduction을 이용하여 하나의 유전체내로 옮겨지게 된다. 이러한 단계를 반복적으로 수행하여 유전체가 축소된 새로운 인공균주를 구축한다.

3. 최소유전체 인공균주를 이용한 Synthetic biology

최소유전체를 갖는 인공균주가 구축되면 이들의 유전자간의 상호작용을 모두 규명할 수 있는 발판을 마련하게 된다. 그리고 이렇게 규명된 genetic network을 고려하여 우리가 원하는 기능의 artificial biological system을 인공균주안으로 넣어 준다면 새로운 기능의 다양한 인공균주를 탄생시킬 수 있다 (Fig. 6). 이러한 Synthetic biology와 결합된 인공균주 기술은 생명공학 산업적인 측면에서 목표물질의 생산이나 분해에 모든 세포역량을 발휘할 수 있는 생산성이 높은 산업용 균주를 탄생시킬 수 있을 것이다. 또한 앞서서 언급한 것처럼, 유해물질이나 환경오염 물질들을 검색하고 분해할 수 있으며 특수 세균이나 암세포 등을 공격하여 소멸시킬 수 있는 강력한 기능을 가진 인공균주들을 생성할 수 있으며, 수소와 같은 차세대 에너지를 기존 보다 높은 효율로 생산해 낼 수 있는 인공균주를 개발 할 수 있을 것이다.

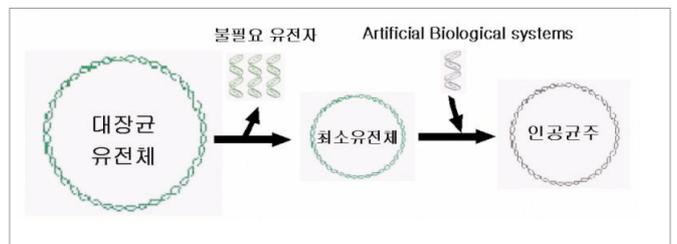


Fig. 6. Artificial Biological system의 최소유전체 인공균주내로의 도입. 대장균 유전체 중 불필요한 부분을 모두 제거 시킨 최소유전체 인공균주에 우리가 원하는 기능의 artificial biological systems을 도입하여 새로운 기능의 인공균주를 구축한다.

결론

미생물을 시작으로 수 많은 생명체의 유전체 구조와 기능이 규명되어 생명현상의 근본이 완전히 밝혀지게 되면 과학자들은 궁극적으로 자기가 원하는 새로운 생명체를 직접 만들어 그 기능을 확인하고 실제 인간생활에 이용하고자 할 것이다. 물론 많은 윤리적 도덕적 문제가 제기되었지만 거대한 과학의 흐름을 멈추게 할 수는 없을 것이다. 기존의 모든 최첨단 과학이 총 동원되고 있는 이 거대한 생명창조의 흐름은 미생물을 이용하여 전 세계적으로 이미 시작되고 있으므로 우리도 이 미래과학의 중심에서 인류의 복지와 행복에 이바지 할 수 있는 방향으로 적극 참여하여야 할 것이다.

참고문헌

1. Ferber, D., Microbes made to order, *Science* **303**, 158 (2004)
2. Collins, J.J. et al., J. J., Programmable cells, *PNAS* **101**, 8414 (2004)
3. Gibbs, W.W., Synthetic life, *Scientific American*, April 26 (2004)
4. Wimmer, E. et al, Chemical synthesis of poliovirus cDNA, *Science* **297**, 1016 (2002)
5. Venter, J.C. et al, Generating a synthetic genome by whole genome assembly, *PNAS* **100**, 15440 (2003)
6. Karp, P.D. et al, The EcoCyc and MetaCyc databases, *Nucleic Acids Res.* **28**, 56 (2000)
7. PEC database. (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec>)
8. *E. coli* genome project University of Wisconsin-Madison . (<http://www.genome.wisc.edu/>)
9. Integrated genomics. (http://www.integratedgenomics.com/online_material/gerdes)

10. Yu B.J. et al, Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system, *Nat Biotechnol.* **20**, 1018 (2002)



김선창 (sunkim@kaist.ac.kr)

한국과학기술원 생명과학과

1979. 03 ~ 1981.12
1981. 09 ~ 1985.11
1985.12 ~ 1991. 08
1991.12 ~ 1994. 02
1992. 09. ~ 현재

서울대학교 대학원 식품공학과 석사
미국 위스콘신 대학교 식품과학과 박사
미국 위스콘신 의과대학교 Research Associate
미국 위스콘신 의과대학교 방문교수
한국과학기술원 교수



유병조 (dolt@kaist.ac.kr)

한국과학기술원 생명과학과

1992.03 ~ 1997. 02.
1997.03 ~ 1999. 02.
1999.03 ~ 2004. 02.
2004.03 ~ 현재

한국과학기술원 생명과학과 학사
한국과학기술원 생명과학과 석사
한국과학기술원 생명과학과 박사
한국과학기술원 생명과학과 Post Doc.

대장균인공균주분양서비스개시! 맞춤형 균주 개발을 위한 *E. coli* artificial strain

다카라코리아바이오메디칼(주)에서는 *E. coli* 관련 연구 및 생명공학 연구의 활성화를 도모하기 위하여, KAIST 분자생물공학 연구실 (김선창 교수)에서 개발한 *E. coli* 유전체들을 적중시키거나 제거할 수 있는 transposon 삽입 *E. coli* mutant 및 맞춤형 인공대장균을 분양하고 있습니다. 이를 위해 loxP site를 가진 transposon을 이용하여 유전자 적중 (knock-out) 및 제거용 (deletion) *E. coli* artificial strain을 개발하였고, 상기 artificial strain을 이용한 combinatorial mutation 및 deletion을 수행함으로써 연구목적에 맞는 유전자균이 적중 및 제거된 맞춤형 균주를 개발할 수 있습니다.

활용방안

E. coli artificial strain은 특정 연구목적에 맞는 균주 개발을 단축할 수 있고, 의약 및 산업용 생물공학 제품을 대량생산할 수 있는 맞춤형 균주로 개량할 수 있습니다. 맞춤형 균주는 생산성을 저해시키는 유전자를 제거하여 생산성을 극대화시키고, 분리정제에 방해가 되는 물질을 제거함으로써 고순도의 생물공학 제품 생산이 가능하며 고부가가치 유용물질 생산에 직접 적용할 수 있습니다.

분양신청

E. coli 관련 연구를 원하는 연구자는 제거하고자 하는 유전체 부위 양 말단에 적절히 위치한 transposon 삽입 *E. coli* artificial strain을 검색한 후 분양신청서를 작성하여 신청하면 됩니다.

자세한 사항은 당사 홈페이지(www.takara.co.kr)나 연구개발센터(Tel : 031-459-6969)로 문의하여 주십시오.